

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

04.06.2004

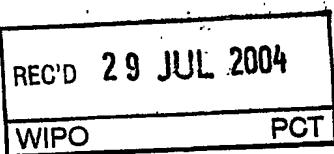
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 6月 6日  
Date of Application:

出願番号 特願2003-163016  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2003-163016]

出願人 山之内製薬株式会社  
Applicant(s): 学校法人慶應義塾

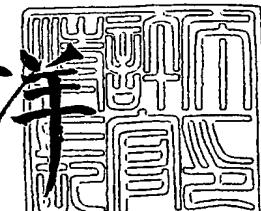


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月14日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

八 月 洋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 0000003275  
【提出日】 平成15年 6月 6日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/00  
【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内  
【氏名】 安永 邦夫  
【特許出願人】  
【識別番号】 000006677  
【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100089200  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 長井 省三  
【電話番号】 03-5916-5111  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100098501  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 森田 拓  
【電話番号】 03-5916-5111  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100109357  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 矢野 恵美子  
【電話番号】 03-5916-5111  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 005348  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 AGFプロモーター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号1の第2705番目～3001番目で表される塩基配列において1～10個の塩基が置換、欠失、付加及び／又は挿入された塩基配列からなり、かつアンジオポエチン関連増殖因子のプロモーター活性を有するDNA。

【請求項 2】 配列番号1の第2705番目～3001番目で表される塩基配列からなるDNA。

【請求項 3】 請求項1又は請求項2に記載のDNAを含み、かつアンジオポエチン関連増殖因子のプロモーター活性を有することを特徴とする組換えベクター。

【請求項 4】 請求項1又は請求項2に記載のDNAを含み、かつアンジオポエチン関連増殖因子のプロモーター活性を有することを特徴とする形質転換体。

【請求項 5】 i) 請求項4に記載の形質転換体に試験物質を接触させる工程、及び、ii) ヒトAGFプロモーター活性を測定し試験物質依存的な前記活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、軟骨組織再生剤、真皮組織再生剤、及び／又は結合組織再生剤をスクリーニングする方法。

【請求項 6】 請求項4に記載の形質転換体が、請求項1又は請求項2に記載のDNAの下流にレポーター遺伝子を保持し、ヒトAGFプロモーター活性を測定する工程がレポーター遺伝子の発現を検出する工程であることを特徴とする、請求項5記載のスクリーニングする方法。

【請求項 7】 軟骨組織再生剤が変形性関節症治療剤である請求項5及び／又は請求項6のスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アンジオポエチン関連増殖因子(以下、AGFと省略する)の発現を亢進する物質である軟骨組織再生剤、真皮組織再生剤及び／又は結合組織再生剤を

スクリーニングする方法に関する。

### 【0002】

#### 【従来の技術】

アンジオポエチン(angiopoietin)ファミリーは、構造の類似性からこれまでに約10種類が知られている。血管内皮細胞や一部の血球細胞に特異的に発現しているチロシンキナーゼレセプターTie2のリガンドであるアンジオポエチン-1、-2が最も良く研究されていて、細胞接着促進、細胞走化、細胞生存延長等の活性によって血管新生に関与していることがわかっている(非特許文献1参照)。

その他の、アンジオポエチン関連蛋白質-1(Angiopoietin Related Protein-1; ARP-1)、アンジオポエチン関連蛋白質-2(Angiopoietin Related Protein-2; ARP-2)、NL8/NEW、飢餓誘導脂肪因子/PPAR $\gamma$  アンジオポエチン因子(fasting-induced adipose factor/peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  angiopoietin-related(FIAR/PGAR))、及びAngPTL3は、レセプターが同定されておらず、生理機能は殆ど解明されていない。

NL8/NEWについては、CHO細胞に安定発現させて、ヌードマウスに皮下移植すると、CHOが腫瘍形成能を持つようになること、いろいろな癌で増幅していることが知られている(特許文献1参照)。NL8/NEWは、そのアミノ酸配列がAng-1、Ang-2と28.8、27.2%の相同性を有し、C末端のフィブリノーゲンドメインで40%以上保存されていること等に基づき血管新生に関するアンジオポエチンのファミリーである可能性が高いと推測されている(特許文献2参照)。また、アンジオポエチンAGFには表皮細胞の増殖作用があることが記載されている(非特許文献2参照)。一方、NL8/NEWのプロモーター領域に関する報告はこれまでになかった。

### 【0003】

ヒトを含む哺乳動物では、一部の両生類で見られるような、高度に分化して複雑な構造を持つ組織の再生は困難であることが知られている(非特許文献3参照)。臓器再生のみならず、骨組織、軟骨組織のような硬組織、及び上皮組織、結合組織、神経組織のような軟組織の外傷、炎症、腫瘍、摘出などにより生じた生体内の欠損部の、組織再生及び機能回復が、再生医学として試みられている。

組織の再生は細胞増殖を伴うため、細胞増殖活性を持つ蛋白性因子の組織再生

剤としての能力が検討されてきた。例えばbasic FGFは、繊維芽細胞増殖活性を持つことから、創傷治癒過程における肉芽形成を促進する活性があり、創傷治癒促進剤として使用されている。しかしながらその活性は限定的であり、例えば、組織を完全に欠損させたマウスの耳パンチを修復する活性は全く無い。

加齢やスポーツ障害による変形性関節症等の関節疾患の治療薬として、軟骨組織の再生活性のあるものの開発が切望されている。変形性関節症は、軟骨組織の欠損を伴う(非特許文献4参照)ので、軟骨細胞の増殖活性や軟骨組織の再生活性のある因子は、変形性関節症の治療薬となる可能性がある(非特許文献5参照)。軟骨は非常に再生しにくい臓器であることが知られている。多方面から軟骨再生に関する研究がなされてきたが、簡便に軟骨を再生することに成功した例はこれまでに報告されていなかった。

#### 【0004】

EGFファミリー、FGFファミリーの多くが表皮細胞増殖活性を有することが知られている。それらの因子の中には表皮細胞以外の細胞に対して増殖活性を持つ因子もあるが、FGF-7やFGF-10のように、多くが表皮細胞を特異的に増殖することが知られている(非特許文献6、非特許文献7参照)。

褥瘡、皮膚潰瘍では、真皮組織の損傷や欠落を伴う場合も多い。そのようなケースでは、表皮細胞を増殖させただけでは病態は改善せず、病態の改善には真皮組織の回復が必要とされている(非特許文献8参照)。

尿失禁、膀胱尿管逆流等の疾患では、コラーゲン等の注入による組織充填療法が用いられている。膀胱頸部や近位尿道粘膜下にコラーゲンを注入し、膀胱頸部、近位尿道の密着を図り、病態の改善を行なう。しかし、この方法では、再発率が高く、完治は困難である(非特許文献9参照)。

#### 【0005】

##### 【特許文献1】

国際公開W099/15653号パンフレット

##### 【特許文献2】

特開2000-300263号公報

##### 【非特許文献1】

「ジーンズ・アンド・ディベロップメント (Genes & Development)」, (米国)  
), 1999年、第13巻、p. 1055-1066

【非特許文献2】

日刊工業新聞 2002年10月2日

【非特許文献3】

「ネイチャー・レビュー・モレキュラー・セル・バイオロジー (Nature Reviews Molecular Cell Biology)」, (英国)、2002年、第3巻、p. 5  
66-574

【非特許文献4】

「エーオーアールエヌ・ジャーナル (AORN Journal)」, (米国)、2000年、第  
71巻、p. 843-845, 848-851

【非特許文献5】

「インストラクショナル・コース・レクチャーズ (Instructional Course Lectures)」, (米国)、1998年、第47巻、p. 487-504

【非特許文献6】

「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal  
of Biological Chemistry)」, (米国)、1997  
年、第272巻、p. 23191-23194

【非特許文献7】

「ジャーナル・オブ・ダーマトロジカル・サイエンス (Journal of dermatological  
science)」, (アイルランド)、2000年、第24巻、Suppl 1:S46-S50

【非特許文献8】

日本臨床 2003年、第 61巻(3), 427-431, 黒柳能光

【非特許文献9】

「ジャーナル・オブ・ウロロジー (Journal of Urology)」, (米国)、2003年  
、第169巻、p. 327-329

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、AGF遺伝子のプロモーター活性を促進しAGFの発現を亢進する

物質である軟骨組織再生剤、真皮組織再生剤及び／又は結合組織再生剤をスクリーニングする方法を提供することにある。

### 【0007】

#### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、様々な長さのヒトAGF(hAGF)遺伝子上流配列を取得し試行錯誤した結果、そのうちの一つの配列がプロモーター活性を有することを見出した。また、前記プロモーター活性を有するDNAを利用したAGFの発現を亢進する物質をスクリーニングする方法を構築した。本発明者らは、AGF蛋白質が強力な組織再生活性を有しており、表皮組織に加えて、真皮組織、皮下組織、軟骨組織を再生することを見出した。これらの知見からAGFの発現を制御する物質をスクリーニングする方法が軟骨組織再生剤、真皮組織再生剤及び／又は結合組織再生剤をスクリーニングする方法として利用できることを見出し本発明を完成した。

### 【0008】

すなわち本発明は、

- [1] 配列番号1の第2705番目～3001番目で表される塩基配列において1～10個の塩基が置換、欠失、付加及び／又は挿入された塩基配列からなり、かつアンジオポエチン関連増殖因子のプロモーター活性を有するDNA、
- [2] 配列番号1の第2705番目～3001番目で表される塩基配列からなるDNA、
- [3] 請求項1又は請求項2に記載のDNAを含み、かつアンジオポエチン関連増殖因子のプロモーター活性を有することを特徴とする組換えベクター、
- [4] 請求項1又は請求項2に記載のDNAを含み、かつアンジオポエチン関連増殖因子のプロモーター活性を有することを特徴とする形質転換体、
- [5] i) 請求項4に記載の形質転換体に試験物質を接触させる工程、及び、ii) ヒトAGFプロモーター活性を測定し試験物質依存的な前記活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、軟骨組織再生剤、真皮組織再生剤、及び／又は結合組織再生剤をスクリーニングする方法、
- [6] 請求項4に記載の形質転換体が、請求項1又は請求項2に記載のDNAの下流にレポーター遺伝子を保持し、ヒトAGFプロモーター活性を測定する工程がレポーター遺伝子の発現を検出する工程であることを特徴とする、請求項5記載

のスクリーニングする方法、

〔7〕 軟骨組織再生剤が変形性関節症治療剤である請求項5及び／又は請求項6のスクリーニングする方法  
に関する。

### 【0009】

#### 【発明の実施の形態】

以下に本発明を詳細に説明する。

### 【0010】

#### 〔1〕 本発明のDNA、組換えベクター、形質転換体

本発明者らは、ヒトゲノムライブラリーを用いてhAGF遺伝子上流の部分配列約200bp、約300bp、約400bp、約600bp、約800bp、約1kbp、約1.3kbp、及び約3kbpを得て、それらの塩基配列を決定した（配列番号1で表される塩基配列の第2796番目～3001番目、第2705番目～3001番目、第2604番目～3001番目、第2406番目～3001番目、第2206番目～3001番目、2021番目～3001番目、1640番目～3001番目、1番目～3001番目で表される塩基配列）。これらのDNA断片を適当なプラスミド、具体的には、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドpGV-B2内にサブクローニングした。これらの融合プラスミドのレポーター遺伝子の発現、すなわち、活性によりルシフェラーゼの発現を検出することによって、得られた上流DNA領域がプロモーター活性を有しているかを確認した。この結果、約400bp～約3kbpの長さのDNAはプロモーター活性を有していないなかつたが、予想外にもそれより短い約300bpのDNAがプロモーター活性を有していることを見出した。更に、約300bpよりも短い約200bpのDNAはプロモーター活性を有していないことを見出した。当該約300bpのDNAを使用することによりAGFプロモーター活性を調節する物質のスクリーニングが可能であり、AGFプロモーター活性を調節する物質すなわち軟骨組織再生剤、真皮組織再生剤、結合組織再生剤及び／又は変形性関節症治療剤の探索を行うことができる。

### 【0011】

本発明のDNAには、

1) 配列番号1の第2705番目～3001番目で表される塩基配列からなるDNA、

2) 配列番号1の第2705番目～3001番目で表される塩基配列において1～10個（好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個）の塩基が置換、欠失、付加及び／又は挿入された塩基配列からなり、かつアンジオポエチン関連増殖因子のプロモーター活性を有するDNA、

3) 配列番号1の第2705番目～3001番目で表される塩基配列との相同性が90%以上（好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上）である塩基配列からなり、かつアンジオポエチン関連増殖因子のプロモーター活性を有するDNA  
が含まれる。

本発明のDNAは下記の方法で製造することができるが、これらの方法に限定されない。

#### ① PCR法を用いた製造

配列番号1の第2705番目～3001番目の5'側に該当する塩基配列からなるプライマーと3'側の配列の相補鎖に該当する塩基配列からなるプライマー、好ましくは配列番号12及び配列番号11で表されるプライマーを合成し、これらのプライマーとヒトゲノムDNAを用いてPCRを行い、配列番号1の第2705番目～3001番目で表されるDNAを製造することができる。ヒトゲノムDNAは、通常用いられる方法によりヒトの適当な組織から調製できる。あるいは、市販品を用いることができる。本発明のDNAは、より具体的には実施例1に記載の方法で製造できるが、この方法に限定されず、例えば、用いるプライマーは配列番号12及び配列番号11とは異なる制限酵素部位を付加することもでき、異なる長さの物を用いることもできる。

#### 【0012】

#### ② DNA合成を用いた製造

配列番号1の第2705番目～3001番目で表される配列の一部分に該当する配列及びその相補鎖を、何本かに分割して化学合成法によって製造し、これらのDNA断片を結合することによっても製造できる。各DNA断片は、DNA合成機（例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman社)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems社)など）を用いて合成することができる。

**【0013】**

当業者であれば、天然型に存在するプロモーター配列の塩基配列の一部を他の塩基への置換や塩基の欠失、及び／又は付加などの改変により、天然型のプロモーターDNAと同等のプロモーター活性を有するDNAを調製することが可能である。このように天然型の塩基配列において塩基が置換、欠失、付加及び／又は挿入した塩基配列を有し、天然型のプロモーターDNAと同等のプロモーター活性を有するDNAもまた本発明のDNAに含まれる。塩基の改変は、例えば、制限酵素あるいはDNAエキソヌクレアーゼによる欠失導入、部位特異的変異誘発法による変異導入(Nucleic Acid Res. 10, 6487 (1982))、変異プライマーを用いたPCR法によるプロモーター配列の改変、合成変異DNAの直接導入などの方法により行うことができる(Maniatis, T. et al. (1989) : "Molecular Cloning - A Laboratory Manual 2nd Edt." Cold Spring Harbor Laboratory, NY)。

上述のように製造したDNAがプロモーター活性を有するか否かは、既知の通常の方法、例えば該DNAの3'下流に適当なレポーター遺伝子DNAを連結させ、これを有核細胞（好ましくは動物細胞株）に導入して培養し、該細胞内のレポーター遺伝子の発現量を測定することにより確認することができる。より具体的には、実施例2記載の方法で確認することができる。

**【0014】**

本発明の組換えベクターは、目的に応じ適宜選択したベクターに、本発明のDNAを組み込むことにより製造できる。ベクターにおいては、発現させる目的の構造遺伝子を含むDNAは本発明のDNAの3'下流に挿入することができる。ここで、構造遺伝子とは、蛋白質をコードしているDNAであれば何でもよく、ORFの全部であっても一部であっても良い。例えば、実施例1に記載したように、ルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子を組み込んだベクターに本発明のDNAすなわちAGFプロモーター活性を有するDNAを組み込んで製造することが好ましい。「レポーター遺伝子」は、一般に用いられるものであれば特に限定されないが、定量的測定が容易な酵素遺伝子などが好ましい。例えば、バクテリアトランスポゾン由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(CAT)、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子(Luc)、クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質遺伝子(GFP)等があ

げられる。好ましくは実施例1に記載の方法により製造できる。製造した組換えベクターがAGFプロモーター活性を有するか否かは、既知の通常の方法にしたがって確認でき、具体的には、組換えベクターを有核細胞（好ましくは動物細胞株）に導入して培養し、該細胞内のレポーター遺伝子の発現量を測定することにより確認することができる。より具体的には、実施例2記載の方法で確認することができる。

また、hAGFの欠損又は発現異常症の遺伝子治療を目的とする場合は、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ髄伴ウイルス等のベクターに、本発明のDNAとhAGFコーディング領域のDNAを組み込むことにより製造できる。

本発明の形質転換体は、目的に応じ適宜選択した宿主細胞に、本発明のDNAを含む組換えベクターを導入することにより製造できる。例えば、hAGFプロモーター活性を調節する物質のスクリーニング系構築を目的とする場合には、マウス、ラットなどの哺乳動物由来の細胞、より好ましくはヒト由来の細胞を用いることができる。細胞株としては、通常の細胞内に存在する転写制御因子等を有する細胞であればよく、より具体的には、例えば市販されている293EBNA、HT-1080又はHe pG2などを用いることができる。

宿主細胞への導入方法としては、以下に限定されないが、DEAE-デキストラン法(Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法(Graham, F. L. and van der Ed, A. J. (1973) Virology, 52, 456-457)、FuGENE6(日本ロシュ社製)を用いた方法、および電気パルス穿孔法(Neumann, E. et al. (1982) EMBO J., 1, 841-845)等が挙げられる。

製造した形質転換体がAGFプロモーター活性を有するか否かは細胞内のレポーター遺伝子の発現量を測定することにより確認することができる。より具体的には、実施例2記載の方法で確認することができる。本発明のDNAを含まない組換えベクターを導入した場合と比較することによって、AGFプロモーター活性を有する形質転換体を選択することができる。

### 【0015】

#### [2] 本発明のスクリーニング方法

AGF蛋白質は非常に強い組織再生活性を有しており、表皮組織に加えて、真皮組織、皮下組織、軟骨組織を再生した(参考例4、5、6)。

従って、AGFプロモーター活性を促進する物質をスクリーニングすることにより、組織再生に有効な物質、特に真皮組織再生、結合組織再生及び／又は軟骨組織再生に有効な物質が取得できると考えられる。

i ) 本発明のDNAに試験物質を接触させる工程、及び、 i i ) hAGFプロモーター活性を測定し試験物質依存的な前記活性の変化を分析する工程を含むことを特徴として軟骨組織再生剤、真皮組織再生剤、及び／又は結合組織再生剤をスクリーニングすることができる。

i ) 配列番号1の第2705番目～3001番目で表される塩基配列からなるアンジオポエチン関連増殖因子のプロモーター領域と融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞に試験物質を接触させる工程、及び、 i i ) レポーター遺伝子の発現を指標として試験物質依存的なレポーター活性の変化を分析する工程を含むことを特徴として、軟骨組織再生剤、真皮組織再生剤、及び／又は結合組織再生剤をスクリーニングすることができる。また、前記と同様の工程により、変形性関節症治療剤をスクリーニングすることができる。

レポーター遺伝子アッセイ（田村ら、転写因子研究法、羊土社、1993年）は、レポーター遺伝子の発現をマーカーとして遺伝子の発現調節を検出する方法である。一般に遺伝子の発現調節はその5'上流域に存在するプロモーター領域と呼ばれる部分で制御されており、転写段階での遺伝子発現量はこのプロモーターの活性を測定することで推測することができる。試験物質がプロモーターを活性化すれば、プロモーター領域の下流に配置されたレポーター遺伝子の転写を活性化する。このようにプロモーター活性化作用すなわち発現亢進作用をレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。したがって、AGFプロモーター領域を用いたレポーター遺伝子アッセイにより、AGFの発現調節に対する試験物質の作用はレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。配列番号1の第2705番目～3001番目で表される塩基配列からなるhAGFのプロモーター領域と融合された「レポーター遺伝子」は、一般に用いられるものであれば特に限定されないが、定量的測定が容易な酵素遺伝子などが好ましい。例えば、バクテリ

アトランスポゾン由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (CAT) 、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子 (Luc) 、クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質遺伝子 (GFP) 等があげられる。レポーター遺伝子は、配列番号1の第2705番目～3001番目で表される塩基配列からなるhAGFのプロモーター領域と機能的に融合されていればよい。hAGFのプロモーター領域と融合されたレポーター遺伝子を細胞（動物細胞あるいは酵母）に安定あるいは一過性に発現させる。ついで形質転換された細胞に試験物質を培養液中で接触した場合と接触しなかった場合のレポーター遺伝子の発現量を比較することにより試験物質依存的なプロモーター活性の変化を分析することができる。

形質転換細胞の作製方法は上記 [1] に記載のものを用いることができる。また、レポーター遺伝子の発現量の解析方法としては、上記レポーター遺伝子がコードする蛋白質により適宜選択される。例えば、レポーター遺伝子がルシフェラーゼのような蛍光蛋白質をコードする場合、導入細胞を適当な方法により溶解し、この細胞溶解液の上清中に基質となるルシフェリンを添加した後、適当な蛍光検出器、例えばML3000等を用いて蛍光を測定し、レポーター遺伝子の発現量とすることはできる。また、この反応は適当な市販の検出キット、具体的には、例えばルシフェラーゼアッセイシステム（プロメガ社）等を用いて行うこともできる。上記工程を実施することにより、AGFの発現を亢進する物質すなわち軟骨組織再生剤、真皮組織再生剤、結合組織再生剤及び／又は変形性関節症治療剤のスクリーニングを実施できる。具体的なスクリーニング法としては、実施例2記載の方法が好ましく、プロモーター活性を促進する物質としては、化合物無添加の1.5倍以上のプロモーター活性化能を有する物質を選択することが好ましい。

### 【0016】

本発明のスクリーニング法で使用する試験物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、市販の化合物（ペプチドを含む）、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンビナトリアルケミストリー技術（Terrettら、J.Steele.Tetrahedron、第51巻、第8135－8173頁、1995年）によって得られた化合物群、微生物の培養上清、植物や海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物、あるいは、本発明のスクリーニング法により選択された化

合物（ペプチドを含む）を化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を挙げることができる。

### 【0017】

#### [3] 軟骨組織再生剤、真皮組織再生剤及び／又は結合組織再生剤

本明細書において、組織再生剤とは、何らかの理由によって損傷を受けた組織の再生を促進する作用を有する薬剤を言う。組織の損傷には、組織の損傷、欠損、変性脱落、線維化を示す状態が含まれる。損傷、欠損、変性脱落、線維化の原因は限定されない。また組織の再生とは、組織を構成する細胞を増殖させ、正常な機能を持った組織が再構成されることを言う。本発明において、再構成とは、医学的に治療効果を達成できたことが確認できる程度に、組織が復元されることを言う。したがって、本来の組織が有する機能の不完全な復元も含まれる。たとえば皮膚の再構成においては、表皮組織や真皮組織の連続性が復元されれば、医学的な治療効果を達成することができる。一般に、皮膚の色、汗腺、毛根、神経などの完全な復元までは要求されない。本発明のスクリーニング方法によって得られる物質により、より高度な再生が期待できることは言うまでも無い。再生能力の作用は、本発明による処置によって再生が早まることを確認することによって評価することができる。

本発明における組織の再生とは、再生の対象となる組織が有する再生機能を増強する場合に加えて、実質的に再生機能を持たない組織において、当該組織を再生する場合が含まれる。皮膚、肝、筋肉、あるいは血管などの組織は、損傷を受けた領域が小さければ再生機能を有する。一方、軟骨には自己再生機能は期待できない。本発明により得られる物質によれば、損傷を受けた領域が大きい場合や自己再生機能を有していない組織においても、組織の再生を実現することができる。

本発明により得られる物質による再生の対象となる組織としては、皮膚組織、上皮組織、軟骨組織、あるいは結合組織などを示すことができる。上皮組織には消化管上皮や表皮組織が含まれる。また皮膚組織には、表皮組織、真皮組織、および皮下組織が含まれる。更に結合組織には、皮下組織および軟骨組織が含まれる。組織再生剤として具体的には、創傷（擦過創、剥離創、切創、感染創、穿孔創

、熱傷創、凍傷、潰瘍、紫外線障害、放射線障害、電撃傷、手術創、水疱性皮膚疾患あるいは褥瘡など) 治癒剤、変形性関節症治癒剤、粘膜組織再生剤、肝再生剤などを挙げることができる。

### 【0018】

表皮細胞増殖活性のある因子として、EGFファミリー、FGFファミリーの多くが知られている。それらの因子の中には表皮細胞以外の細胞に対して増殖活性を持つ因子もあるが、FGF-7やFGF-10のように、多くが表皮細胞を特異的に増殖することが知られている (J Biol Chem 1997、272(37):23191-23194、Emoto H. ら) (J Dermatol Sci 2000、24 Suppl 1:S46-S50, Hashimoto K.)。即ち、ある因子が表皮細胞増殖活性を持つという情報のみからでは、当該因子が真皮組織や結合組織を構成する纖維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、軟骨細胞等の他の細胞の増殖活性を持つとは考えられず、真皮組織や結合組織の再生活性があるとは考えられない。褥瘡、皮膚潰瘍では、真皮組織の損傷、欠落を伴う場合も多い。そのようなケースでは、表皮細胞を増殖させただけでは真皮組織の回復はできず、病態を改善しない。このような疾患の治療に真皮組織再生活性を有するAGFは有効であり、すなわちAGFの発現を亢進させる本発明のスクリーニング方法により得られる物質は有効である。

尿失禁、膀胱尿管逆流等の疾患では、コラーゲン等の注入による組織充填療法が用いられている。膀胱頸部や近位尿道粘膜下にコラーゲンを注入し、膀胱頸部、近位尿道の密着を図り、病態の改善を行なう。しかし、この方法では、再発率が高く、完治は困難である。一方真皮組織や結合組織自体を増殖、肥厚させるAGF、及びAGFの発現を亢進させる本発明のスクリーニング方法により得られる物質によれば永続的な治療効果が得られる。

本発明のスクリーニング方法によって得られる物質は、好ましくは軟骨組織、真皮組織および結合組織の全ての組織に対して再生作用を有する。これらの組織を構成する細胞に対して、AGF蛋白質が細胞増殖作用を有することは、参考例に示すとおりである。

関節症は関節軟骨組織の損傷及び/または変性を伴う関節疾患である。変形関節症の治療作用は、本発明により得られる物質を投与することによって軟骨組織が

再生し、軟骨組織の損傷及び／又は変性の進行の制御を確認することによって評価することができる。

### 【0019】

参考例を以下に示す。特に断りがない場合は、公知の方法（「Molecular Cloning」Sambrook, J.ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年、等）に従って実施可能である。また、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って実施可能である。

### 【0020】

#### [参考例1] マウスAGFのクローニング

AGFの増幅にはフォワードプライマーとして配列番号：2、リバースプライマーとして配列番号：3を用いた。RT-PCRはPyrobest DNA polymerase（宝酒造社）を用い5% ホルムアミド存在下で98°C (20秒) / 64°C (30秒) / 74°C (3分) のサイクルを35回繰り返した。その結果、約1.5 kbpのDNA断片が増幅された。この断片をpCR2.1 プラスミド（インビトロジェン社）を用いてクローニングし、プラスミドpCR2.1-mNewを得た。得られたクローンの塩基配列はダイデオキシターミネーション法によりABI377 DNA Sequencer（アプライドバイオシステムズ社）を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号4に示す。同配列は1374 base のオープンリーディングフレーム（配列番号4の第1番目から第1374番目）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（457アミノ酸）を配列番号5に示す。マウスAGFは、N末端にシグナル配列（-24~-1）を持ち、細胞外に分泌発現される際にシグナル配列が切断される。シグナル配列が切断された配列番号5の1番目から433番目までのアミノ酸からなるマウス成熟AGFが、生理活性を有する。

配列番号5記載の1番目から433番目までのアミノ酸配列（マウス）はヒトNL8/NEW又はangiopoietin-related protein 5として公知のヒトAGFアミノ酸配列（Genbank accession番号NP\_114123の21番目から470番目）と76%の相同性を有していた。特に、アンジオポエチンファミリーに属する蛋白質の活性において重要であることが知られるC末端側のフィブリノーゲンドメイン(William N. Procopio et al., J.Biol.Chem. 274: 30196-30201 (1999))においては89%という高い相同性

を有する。このように活性を維持する上で重要と予想される領域の相同性が高いことから、配列番号4で表されるマウスAGFはヒトAGFのカウンターパートであり、マウスAGFとヒトAGFとは同等の活性を有するものと予測された。なお、アミノ酸配列の相同性は、BLAST検索アルゴリズムを用いて決定した。具体的には、BLASTパッケージ（sgi32bit版、バージョン2.0.12、NCBIより入手）のbl2seqプログラム（Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden, FEMS Microbiol Lett. 174: 247-250 (1999)）を用い、デフォルトパラメーターに従って算出した。ペアワイズ アライメント パラメーターとして、プログラム名blastp、Gap挿入Cost値を0、Gap伸長Cost値を0、Query配列のフィルターとしてSEG、MatrixとしてBL0SUM62を使用した。

### 【0021】

#### [参考例2] AGF発現OP9細胞株の作成

参考例1で作製した、pCR2.1-mNewを制限酵素XbaIとSpeIで切断し、1.4kbのmous AGF遺伝子を含む断片を得た。この断片を、XbaIで切断してBAP処理したpEF-BOS-neo (Mizushima, S., & Nagata, S. Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990)) に挿入して、マウスAGFの発現ベクターpEF-BOS-mAGFを作製した。Fugene6法 (Roche Diagnostics社) を用いて、添付プロトコールに従い、OP9細胞にpEF-BOS-mAGFをトランスフェクションした。300 μg/mlのGeneticin (Roche Diagnostics社) 存在下で、トランスフェクションした細胞を培養することで、マウスAGFの安定発現株 (OP9/AGF)を得た。更に、ネガティブコントロール用として、マウスAGF遺伝子を含まないpEF-BOS-neoベクターのみをトランスフェクションしたOP9細胞株 (OP9/vector)を得た。

### 【0022】

#### [参考例3] AGF Tgマウスの作製

以下の方法で、表皮細胞へマウスAGFを強制発現させたAGF Tgマウスを作製した。

pBSII KS(+)のマルチクローニングサイトに、human K14 Promoter (2kb)、rabbit β globin intron (0.8kb)、human K14 polyA signal (0.5kb)を挿入して、hK14PIMApBSIIKS(+) (T. Kunisada et al., Mech. Develop. 94(1-2): 67-78 (2000))を得た。

00)）を作製した。hK14PIMApBSIIKS(+)を制限酵素KpnIで切断し、BAP処理後、配列番号：6で示される核酸と配列番号：7で示される核酸をアニールさせた二重鎖オリゴヌクレオチドを挿入し、human K14 Promoterの5'側にSalIサイトを導入し、プラスミドhK14PIMApBSIIKS+SalIを作製した。

参考例1で作製した、pCR2.1-mNewを制限酵素XbaIとSpeIで切断し、1.4kbのmouse AGF遺伝子を含む断片を得た。この断片を、XbaIで切断してBAP処理したhK14PIMApBSIIKS+SalIに挿入して、rabbit  $\beta$  globin intronとhuman K14 poly A signalの間にmouse AGF遺伝子をもつプラスミドを得た。このプラスミドをSalIで切断後単離精製して、K14プロモーター、rabbit  $\beta$  globin intron、mouse AGF、human K14 poly A signalの順に並んだ約4.7kbの断片K14-mAGFを得た。

K14-mAGFをC57BL/6マウスとDBA2マウスのF1交雑マウスの受精卵250個にマイクロインジェクションした後、同受精卵を仮親ICRマウスの卵管に移植した(Hogan, B. et al. (1986). Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual, Plainview, New York: Cold Harbor Press)。妊娠マウスを自然分娩させ、得られた仔マウス88匹についてTgマウスの同定を行った。

Tgマウスを同定するため、仔マウスの尻尾より単離したゲノムDNAを鑄型としてPCRを行った。尻尾をProteinaseK処理し、DNAをフェノールクロロホルム抽出した。抽出したDNAは、イソプロパノール沈殿、およびエタノール沈殿によって回収しTE溶液に溶解した。K14-mAGFに含まれる $\beta$  globin intron配列及びマウスAGF cDNA配列（配列番号：4）に基づいて次の塩基配列からなるプライマーをデザインした。

フォワードプライマー：配列番号：8

リバースプライマー：配列番号：9

このプライマーを用いてPCRを行うと、導入遺伝子からは760bp断片が増幅され、マウスゲノムDNAからは断片が増幅されないはずである。前記プライマーを用いて、得られた仔マウス由来ゲノムDNAについてPCRを行った。PCRはDNAポリメラーゼ(AmpliTaq, Roche社)を用いて、95°C(5分)熱変性を行った後、95°C(1分)、60°C(1分)、72°C(1分)を30サイクル実施し、更に72°C(7分)の伸長反応を行い、増幅される断片のサイズを調べた。その結果、仔マウス88匹中16匹がTgマウスで

あることが同定された。

導入された遺伝子が実際に機能しAGF mRNAが過剰発現していることを確認するため、Tgマウスの皮膚でのAGF mRNAの発現を解析した。mRNAの発現解析のためのF1マウスを得るため、Tgマウス16匹についてBalb/cマウスと交配させた。得られたF1 Tgマウス（0週齢）から皮膚を摘出し、それぞれRNAを単離した。得られたRNAを用いて、以下の方法でノーザンプロット法によりmRNA発現の検討を行った。Clontech社の、Mouse MTN Blot、Mouse MTN Blot embryoのメンブレンを用いてハイブリダイゼーションを行った。プローブとして上記クローニングで得られた1.4kbのマウスAGF遺伝子をソースにDNAラベル化キット（BcaBEST DNA labelling system:Takara社）を用いて行った。ハイブリダイゼーション液は、ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech社)を用いた。プレハイブリダイゼーションは42℃にて2時間、ハイブリダイゼーションは42℃にて16時間行った。また、メンブレンの洗浄は2xSSPE/0.1%SDS 室温にて10分間、1xSSPE/0.1%SDSで68℃15分間、さらに0.5xSSPE/0.1%SDSで68℃15分間洗浄後空気中で乾燥させ、増感スクリーンを使用しオートラジオグラフィーを行った。その結果、3系統のTgマウスでAGF mRNA過剰発現が認められた。

得られた3系統のF1TgマウスをBalb/cマウスと交配させ、F2マウスを得た。更に同様にBalb/cマウスと交配を重ねて、F3マウスおよびF4マウスを得た。ホモ接合体は、F4Tgマウス同士を交配させて作製した。これらのF3マウス、F4マウスに関しても、F1マウスと同様に、配列番号：8および配列番号：9からなるプライマーを用いたPCRにより、Tgマウスであることの確認、およびノントランスジェニックマウスであることの確認を行った。以下の参考例では、Tgマウスはこの様な方法で得たF3マウスまたはF4マウスのTgマウス、および正常マウスは、F3マウスまたはF4マウスのTgマウスと同胞のノントランスジェニックマウスを使用した。

### 【0023】

#### [参考例4] AGF Tgマウスの耳パンチ閉塞活性

AGF蛋白の真皮組織、皮下組織、軟骨組織への作用を調べた。マウスの耳は、表皮組織、真皮組織、皮下組織、軟骨組織で形成されているため、マウスの耳に

穴を開けて、AGF蛋白によるこれらの欠失させた組織の修復活性を調べた。

8週齢のAGF Tgマウスと正常マウスの耳の中央部に、メタル耳パンチ（夏目製作所社）で、直径2mmの完全に貫通した穴を開けた（以後この穴を耳パンチと呼ぶ）。その後、マウスを通常に飼育し、耳パンチの大きさを観察した。その結果、正常マウスの耳パンチの大きさはほとんど変化が無かったが（図1、C,D）、AGF Tgマウスは経時的に小さくなり、穴を開けてから28日目にはほぼ完全に耳パンチが閉塞した（図1、A、B）。AGF Tgマウスでは、耳の表皮細胞からAGF蛋白が発現されているので、AGF蛋白に、耳の組織を再生して穴を開塞させる活性があることが判った。

次に、再生された耳の組織を観察した。穴を開けてから28日間飼育したAGF Tgマウスの耳を切り出し、4% パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンで包埋して、薄切切片を作製した。薄切切片は、図1のBに示すように、耳パンチで穴を開けていない領域（E）と穴を開けて組織が再生された領域（F, G, H）を作製した。周縁部から中心に向かって経時的に組織が再生されて穴が小さくなっていくので、図1、Bの図中のF, G, Hの領域は、F, G, Hの順番で組織が早く再生されている領域である。薄切切片をヘマトキシンエオジン染色して、顕微鏡下で組織を観察して、写真撮影をした（図1、E～H）。図1、Fには、耳パンチで穴を開けていない組織由来の領域（左端の枠内）と、穴を開けて組織が再生された領域（中央部の枠内）があるので、これらの領域を拡大して各々写真撮影した（図1、I及びJ）。図1、I及びJの、軟骨組織の一部を矢印の頭部で示した。

通常のマウスの耳の組織は、表層より、表皮、真皮、皮下組織と層構造を形成していて、中心部に軟骨組織がある（図1、E）。組織が再生した領域は、最初は表皮及び真皮組織で形成されているが、引き続き皮下組織が形成され、血管も形成されていた。更には、皮下組織の中央部分に軟骨組織の形成が観察された（図1、F, J）。

マウスの耳パンチは通常永久に閉塞することが無く、個体識別に利用されている。これまでに、マウスの耳パンチを閉塞する活性のある因子は知られておらず、唯一MRLマウスに同様の現象が起きることが知られているが耳パンチの閉塞を促進する因子は同定されていない（Clark L.D. et al., Clin Immunol Immunopathol

hol 1998, 88(1), 35-45)。AGF蛋白には、これまでに知られていない非常に強い組織再生活性があることが判った。また、AGF蛋白は、表皮組織に加えて、真皮組織、皮下組織、軟骨組織を再生する能力があることが判った。組織が再生されるためには、組織を構成する細胞が増殖することが必要であるため、AGF蛋白には、これらの組織を構成する細胞、即ち、纖維芽細胞、血管内皮細胞、軟骨細胞等の増殖活性があることが判った。AGF蛋白は、軟骨組織を再生する活性を有していることから変形性関節症治療剤として用いることができると考えられた。

#### 【0024】

##### [参考例5] OP9細胞由来組換え体AGFの耳パンチ閉塞活性

AGFによる耳パンチ閉塞活性を、組換え体AGFを発現するOP9細胞株を用いて調べた。8週齢のBalb/cヌードマウスに、直径2mmの耳パンチを開けて、1時間後に写真撮影した（図2）。参考例2で作製したマウスAGFの安定発現株（OP9/AGF）及びマウスAGF遺伝子を含まないpEF-BOS-neoベクターのみをトランスフェクションしたOP9細胞株（OP9/vector）を培養し、マウスへの投与時にトリプシン処理で培養プレートから剥がし、PBSに懸濁した。耳パンチを開けてから4、8、12、16及び20（日目）に、PBSに懸濁した $5 \times 10^6$ cellsのOP9/AGF又はOP9/vectorを、Balb/cヌードマウスの腹腔内に投与した。その結果、OP9/vectorを投与したマウスの耳パンチは穴の大きさに変化は無かったが、OP9/AGFを投与したマウスの耳パンチは経時的に穴が小さくなり、耳パンチを開けてから20日目には顕著に穴が小さくなった。OP9/AGFを投与したマウス、及びOP9/vectorを投与したマウスを、耳パンチ後20日目に写真撮影した（図2）。

OP9/AGFは組換え体AGFを発現することがわかっている。従って、OP9/AGFを腹腔内に投与したマウスでは、OP9/AGFより発現した組換え体AGFが、耳パンチにより欠損させた組織を修復再生して、穴を小さくさせたことが判った。

#### 【0025】

##### [参考例6] AGFの軟骨細胞増殖活性

AGFの軟骨細胞増殖活性を、In Vitroで調べた。レトロウイルス発現系で利用できる、green fluorescent protein(GFP) の発現ベクターであるpEGFP-MY (Onai N. et al., Blood, 96(6), 2074-2080, 2000) をマウス前駆軟骨細胞株 ATDC5に

導入した。レトロウイルスの作製、ATDC5へのインフェクションはMiyamotoらの方法 (Miyamoto T. et al., Blood, 98(8)、2544-2554、2001) に従って実施した。

インフェクションした細胞をATDC5培養培地 (DMEM/F-12 (Lifetechnologies社)、5% FCS、5 microgram/ml インスリン、5 microgram/ml トランスフェリン、 $3 \times 10^{-8}$  mol/litter sodium selenite) で培養し、コンフルエントになる前にトリプシン処理により培養プレートより剥がして細胞を分散した。分散した細胞を、細胞分離装置 (FACS vantage, Becton Dickinson社) にかけて、GFPの蛍光を持つATDC5を分離回収して、GFPを発現するATDC5を得た。得られたGFPを発現するATDC5を培養、増殖して、もう一度同様に上記の細胞分離装置によるGFPを発現する細胞の分離回収を実施し、安定的にGFPを発現するATDC5(ATDC5/GFP)を得た。参考例2で作製した、AGF安定発現OP9細胞株 (OP9/AGF) 及び、コントロールOP9細胞株 (OP9/vector) を12ウェルプレートにコンフルエントになるまで培養した。このプレートに、ATDC5/GFPを50cells/ウェルで撒き、ATDC5培養培地で14日間培養した。蛍光顕微鏡でATDC5/GFPの増殖を調べた。

その結果、OP9/vectorをfeeder細胞とした場合は、ATDC5/GFPのコロニーは全く形成されおらずATDC5/GFPは増殖していなかった。一方OP9/AGFをfeeder細胞とした場合は、ATDC5/GFPのコロニーが、1ウェル当たり約16コロニーと多数形成されており、ATDC5/GFPが顕著に増殖していた。OP9/AGFは、リコンビナントAGF蛋白を発現するので、リコンビナントAGFにATDC5/GFPの細胞増殖活性があること、即ちリコンビナントAGFに軟骨細胞増殖活性があることが判った。

### 【0026】

#### 【実施例】

以下、実施例によって本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (『Molecular Cloning』 Sambrook, J. ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年、等) に従って実施可能である。また、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って実施可能である。

### 【0027】

## &lt;実施例 1 &gt; hAGF mRNA転写領域上流配列のクローニング

(1-1) hAGF mRNA転写領域上流の約200, 約300, 約400, 約600, 約800(bp)のクローニング

ヒトゲノム (Genomic DNA ; クロンテック社) を鑄型にし、DNAポリメラーゼ (Takara LA taq<sup>TM</sup> ; 宝酒造社) を用い、95°C2分の後、94°C30秒、60°C30秒、72°C1分のサイクルを40回、続いて72°C5分の条件でPCRを行った。プライマーセットとしては、(配列番号 10、配列番号 11)、(配列番号 12、配列番号 11)、(配列番号 13、配列番号 11)、(配列番号 14、配列番号 11)、及び(配列番号 15、配列番号 11) で表される塩基配列からなる5種類のプライマーセットを用いた。それぞれのプライマーセットを用いて得られた約200, 約300, 約400, 約600, 及び約800 bpの断片をクローニングベクター (pCR2.1-TOP10 ; インビトロジェン社) に各々サブクローニングした。ここで得られた各サブクローンを制限酵素KpnI及びNheIで処理し、配列番号 1 で表される塩基配列の第2796番目～3001番目、第2705番目～3001番目、第2604番目～3001番目、第2406番目～3001番目、第2206番目～3001番目で表される各塩基配列を含む断片を、制限酵素KpnI及びNheIで処理したルシフェラーゼアッセイシステム用ベクター pGV-B2 (PicaGene Vector 2 ベーシックベクター ; 東洋インキ社) に挿入し、pGV-hAGFpro200(N6)、pGV-hAGFpro300(N6)、pGV-hAGFpro400(N6)、pGV-hAGFpro600(N6)、pGV-hAGFpro800(N6)を得た。

このようにして、配列番号 1 で表される塩基配列の第2796番目～3001番目、第2705番目～3001番目、第2604番目～3001番目、第2406番目～3001番目、第2206番目～3001番目で表される各塩基配列、すなわちヒトAGF mRNA転写領域の上流の約200bp、約300bp、約400bp、約600bp、及び約800bpの領域をクローニングし、そのプロモーター活性の測定が可能なプラスミドを作製した。

(1-2) hAGF mRNA転写領域上流の約1k, 約1.3k, 約3k(bp)のクローニング

hAGF mRNA転写領域上流の約1k及び約1.3kのクローニングはPCRを用いて行なった。約1kbの領域のクローニングには、フォワードプライマーとして、配列番号 16 を、リバースプライマーとして、配列番号 17 を使用し、約1.3kbの領域の

クローニングには、フォワードプライマーとして、配列番号18を、リバースプライマーとして配列番号17を使用した。ヒトゲノム（Genomic DNA；クロントック社）を鋳型にし、これらのプライマーセット並びにDNAポリメラーゼ（TaKaRa LA taq<sup>TM</sup>；宝酒造社）を用い、95℃2分の後、94℃30秒、60℃30秒、72℃3分のサイクルを45回、続いて72℃5分の条件でPCRを行った。得られた約1kb及び1.3kbの断片をクローニングベクター（pCR-XL-TOP0；インビトロジェン社）にサブクローニングした。各サブクローンをKpnI及びNheI処理し、得られた断片（すなわち、配列番号1で表される塩基配列の第2021番目～3028番目、第1640番目～3028番目で表される各塩基配列を含む断片）を、KpnI及びNheI処理したpGV-B2に挿入し、pGV-hAGFpro1k(N4)及びpGV-hAGFpro1.3k(N4)を得た。

更に、フォワードプライマーとして配列番号19、リバースプライマーとして配列番号20を使用し、ヒトゲノム（Genomic DNA；クロントック社）を鋳型にしてDNAポリメラーゼ（TaKaRa LA taq<sup>TM</sup>；宝酒造社）を用い、95℃2分の後、94℃30秒、63℃30秒、72℃2分30秒のサイクルを45回、続いて72℃5分の条件でPCRを行った。

得られた約2kbの断片を、クローニングベクター（pCR-XL-TOP0；インビトロジェン社）へサブクローニングした。ここで得られたサブクローンをKpnI及びXmaI処理し、配列番号1で表される塩基配列の第1番目～1768番目で表される塩基配列を含む断片を得た。pGV-hAGFpro1.3k(N4)には、hAGF mRNA転写領域上流配列中とpGV-B2ベクターのクローニングサイト中との2箇所にXmaI制限酵素サイトが存在する。8.7 μgのpGV-hAGFpro1.3k(N4)を5unitsのXmaI制限酵素で1～10分間処理することで、XmaIが、0, 1, 又は2箇所切断されたプラスミドを作製した。1箇所のみ切断したプラスミドを電気泳動で分離抽出した。更にKpnI処理を行い、電気泳動により6.1kbのサイズに分離される断片を得ることで、pGV-B2ベクターのクローニングサイト中のXmaIサイトが切断されず、hAGFプロモーター領域の配列中のXmaIサイトのみが切断されたプラスミドを得た。このプラスミドに、先に述べた方法（KpnIとXmaI処理）で得た、配列番号1で表される塩基配列の第1番目～1768番目で表される各塩基配列を含む断片を挿入して、pGV-hAGFpro3k(N4)を得た。pGV-hAGFpro800(N6)をSnaBI及びXbaI処理し、約2kbの断片（N6断片）を得た。p

GV-hAGFpro1k(N2)、pGV-hAGFpro1.3k(N4)及びpGV-hAGFpro3k(N4)をSnaBI及びXba I処理して、切り出される約2kbpの断片を除去した。これらに、N6断片を挿入することで、pGV-hAGFpro1k(N6)、pGV-hAGFpro1.3k(N6)、pGV-hAGFpro3k(N6)を得た。これらのプラスミドは、レポータープラスミド中に、配列番号1で表される塩基配列の2021番目～3001番目、1640番目～3001番目、1番目～3001番目で表されるhAGFのプロモーター領域の塩基配列をそれぞれ持つ。

このようにして、配列番号1で表される塩基配列の2021番目～3001番目、1640番目～3001番目、1番目～3001番目で表される塩基配列であるhAGF mRNA転写領域の上流の約1kbase、1.3kbase及び約3kbaseの領域をクローニングし、そのプロモーター活性の測定が可能なプラスミドを作製した。

#### 【0028】

##### <実施例2>ヒトAGFプロモーター領域DNA配列の解析

i) pGV-B2(空ベクター)、実施例1で得られたプラスミドpGV-hAGFpro200(N6)、pGV-hAGFpro300(N6)、pGV-hAGFpro400(N6)、pGV-hAGFpro600(N6)、pGV-hAGFpro800(N6)、pGV-hAGFpro1k(N6)、pGV-hAGFpro1.3k(N6)、及びpGV-hAGFpro3k(N6)、並びにii)  $\beta$ -gal発現プラスミド(pCH110；アマシャムファルマシアバイオテック社)をトランスフェクション試薬(FuGene-6；日本ロッシュ社)を用い、10%牛胎児血清、100 $\mu$ g/mLペニシリン、及び100 $\mu$ g/mLストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)で培養していた293EBNA細胞(インビトロジエン社)に導入した。通常の培養条件で48時間培養後のルシフェラーゼ活性を、市販の測定キット(PicaGene発色キット；東洋インキ社)を用いて測定した。この際、測定値は同時導入した $\beta$ -gal発現プラスミドより発現した $\beta$ -galの活性値で補正した。 $\beta$ -gal活性の測定は市販の測定キット(Galacto-Light Plusキット；ロシュ社)を用いた。その結果、約400bp～約3kbpのDNAを含むプラスミド(pGV-hAGFpro400(N6)、pGV-hAGFpro600(N6)、pGV-hAGFpro800(N6)、pGV-hAGFpro1k(N6)、pGV-hAGFpro1.3k(N6)、及びpGV-hAGFpro3k(N6))を導入した細胞では、ルシフェラーゼ活性の上昇は観察されなかった。意外にも、それらより短い領域である約300bpのDNAを含むプラスミド(pGV-hAGFpro300(N6))を導入した細胞では、空ベクターを導入した細胞では認められないルシフェラーゼ活性の明らかな

上昇が観察された（図3A）。また、更に短い約200bpのDNAを含むプラスミド（pGV-hAGFpro200(N6)）を導入した細胞では、ルシフェラーゼ活性の上昇は観察されなかった（図3B）。このことは、配列番号1で表される塩基配列の2705番目～3001番目で表される約300baseの領域内にプロモーター活性が存在することを示している。更に、この約300baseのプロモーター活性を持つ領域の上流の配列中に、プロモーター活性を減弱させるサイレンサーが存在することを示している。配列番号1で表される塩基配列の2705番目～3001番目で表される約300baseのDNA配列を利用したレポーターアッセイを構築でき、当該領域にAGFプロモーター活性が含まれることを見出した。本アッセイ系において、好ましくはpGV-hAGFpro300(N6)導入後の細胞に試験化合物を添加し、ルシフェラーゼ活性の変化を分析することにより、AGF遺伝子のプロモーター活性を促進しAGFの発現を亢進する物質である軟骨組織再生剤、真皮組織再生剤及び／又は結合組織再生剤をスクリーニングすることができる。

#### 【0029】

##### 【発明の効果】

本発明のスクリーニングする方法は軟骨組織再生剤、真皮組織再生剤及び／又は結合組織再生剤をスクリーニングするのに有用である。

#### 【0030】

##### 【配列表フリーテキスト】

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号2、8～18、及び20の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。配列番号6及び7は人工的に合成したリンカー配列である。

#### 【0031】

##### 【配列表】

##### SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd

<120> AGF promotor

<130> 3275AGF

<160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3028

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gtcttggcct caggcctctg gcttcttccc caaaaccttg cagtggggga aagggacacc 60

ccctcaactgg gctgaacatt actctctcct ccccatcggt ctcctctcc ctccttgctc 120

tctctggcac cccaattctt ctcctctcc cccagatgtg tctccctcc ccctcgctt 180

ccccctgtct ct当地ccctt ctgttaactt tgtctctgtc atcagttgtc tcttcatca 240

tttataactg aagatggaaa ctaaagaagt ttcccttctc tgtgtctggc cccatccctg 300

tttctttctt ctcatctgcc tccctgtggc ctctccat cttccatct ctctctgtct 360

ctccccatct ccccgctctt ccctttctt gccatctccc tatgtctctc ccatctccct 420

atgcctctcc catctccatc tgtctgactc tctgtattct tcagccctc tctgtgactt 480

atgaagttcc ctccctctc actgccaatg gggaaaggccag agggggctga gggtgggggg 540  
ccgagggggcc cagtgtgggg gccccaaccc aggcccagag cccagcctgg cagcctctc 600  
cagatctggg acgaccattt ccttttcaa ccctggagtc cactcgagtt actcgggagc 660  
tcaggatggt gcagaccagg ggaaggaggt gactctcccg gcgtgtggct ggtcgtcggt 720  
ggggccttg gacaggtctc agaccctggg cctggctct gtgggctct atgtgagtt 780  
ctttgtaccc ctggaaatg actgcatggt tactcccc agttccgtcc tcgtgtgatt 840  
tgacttgtgt gaaaatgtga ccgagtgtgt gggagacaga cggtgaccctc tgtggtgccg 900  
tggataggtt tccgggtgtc aactgtgtgt acctgttttgc tatctgtgca ctactgtgtg 960  
atcacaagaa ccaggatgtg gacaaggctg acacacagat aaagaccac tcagcccacc 1020  
ccatttccct ttaagtgtg atgtgtgtgt gaccatattt ggaacataca gttgtgcct 1080  
gaaactgtta tgtttccagc tgtgtcttt taaaaatttt tttaatcaa tgagatatcc 1140  
tttattttagt aaagcatagt tccaatgcag aagtcaagct ttatggttat atattaggat 1200  
aggttcagat ccaatatgac aatgttagc actaacttta acatgtaaa gctctgattc 1260  
ctgaatgttt ttctcactta atatattctc tccaatgaca agctggtgtg ctggcttct 1320

tatgctaaaa aatatatgcc tgaattctat aacaagctat taacaaaatc atgaatagtt 1380  
aattaaataa gtgccaacac tacatggAAC ttactggCCA ccaactcaga accataaaAC 1440  
tacacacaca cacacacaca cacacacaca ccacacacac aaacaaaaca aaaaaaacac 1500  
caaagaaaga tagctatcac tgtacatATG aatactgtcc aggatATCAG atcaattATC 1560  
aaatCCAagg tctctggTGT tttgtctCAC agtgtGAAT atatGAATGC ttctcttATA 1620  
tactgacttg tattattTC aacaataat tatgtggACT caaaatCTTA catttttATT 1680  
tctttcttt ttttttttt tttttgaga cagagtCTTA ctctgtcgCC caggctggAG 1740  
tgcagtggct cactgcaACC tccggcccccc gggttcaAGC gatttcctG cctcagcctc 1800  
ctgagtagct gggattacAG gcatggGCCA ccacacCCGG caaatTTTG tattttAGT 1860  
agagacgggg tttcaccatC ttggccaggC tggtctcgAA ttgctgacct cgtgatctGC 1920  
ccgccttggc ctcccaaAGt gctgggatta caggcgtgag ccaccgcGCC cagccttaca 1980  
tttttattTC taattataAA atccagatta atccaaaaAA cataaatCAC atgtaactGA 2040  
ggtagggTTT tcacttiaAG aatatattGT ttctatCACa atttaAAAAT ttacagCTGT 2100  
gtctttata tttttttt atttaatta attaattCCT cactttatta ttattttt 2160  
attatttatt tatTTatTTA tttattttt tttgagatGG aatttcagTC ttgtcgcccA 2220

ggctggagtg catgcgttg ctgcgtcg gcttactgca acctccaccc cctggctca 2280  
agcaattctc ctgcctcagc ctcccgagta gctgggatta ctggcgcatg ccaccatgcc 2340  
cagctaattt ttgtattgtt agtagagacg gggtttagc atgttggcaa ggatggttc 2400  
gaactcctga cctcaggtaa tccacctgcc ccggcctccc aaagtgcgtgg ctttcaggca 2460  
tgagccactg cacccagact ttcgcgtgggt gttaatgtgt gcgtgcgtgc aaatgtgtgt 2520  
gtgtgtgttt gtgtccactc ttttatgtgc ccatatgtgt gtgacagctg tggtgtacat 2580  
gtgtgagttt ctgagtcaag ctacccgttgc tggctccat cctggctct tttggctgt 2640  
gtgaccgcag gcaagttgct taccctctct gagcctcagt tttccctgct gtaaaatgag 2700  
ggtacataca gaatccagct caggttgtaa ggatcaaata cgtaaaaggt gtggagagtt 2760  
tagagccaag ccctacacac ggttaagtccc cagtgtatgtt cctcttctta tgtgtgggt 2820  
gtgcgtgtct ggggctggta tcacgcgtgg ctgccccagg gcctgcagcc tcccacgctc 2880  
tgggctctgc agtggagggt gtgggggaaa gggagggatg tccaggacac tgacctgtgt 2940  
tatcaggctc tggtggcctg ggcagggggg tctggcaatt ctgtctcatt tctcattcgg 3000  
gaaatgctaa atatttatag tttgggct 3028

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 2

agtctagaat ggggaccgcc aggctacgca agctgc

36

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

aggagatagg aacacccttg ggggtact

28

<210> 4

<211> 1412

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1371)

<223>

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (73)..(1371)

<223>

<400> 4

atg ggg acc gcc agg cta cgc aag ctg caa ctg ctg ctt ctg ctg ggc 48  
 Met Gly Thr Ala Arg Leu Arg Lys Leu Gln Leu Leu Leu Leu Gly  
 -20 -15 -10

gct tgg agg gcg ctc gga ggt gcc gcg cgt tgc cgc gtc acc cta gtt 96  
 Ala Trp Arg Ala Leu Gly Gly Ala Ala Arg Cys Arg Val Thr Leu Val  
                  -5                         -1   1                 5

ttg tcc ccg cag aag gca act agc gcc gtc tgc agg agc tca gag gcc 144  
 Leu Ser Pro Gln Lys Ala Thr Ser Ala Val Cys Arg Ser Ser Glu Ala  
                  10                 15                 20

acc caa gac agc gaa ctg gcc acg ctg cgc atg cgc ctg ggt cgc cac 192  
 Thr Gln Asp Ser Glu Leu Ala Thr Leu Arg Met Arg Leu Gly Arg His  
 25 30 35 40

gag gag ctg ctg cgc gcg ctg caa agg cgt gcg gcg gag ggt ggt gcg 240  
 Glu Glu Leu Leu Arg Ala Leu Gln Arg Arg Ala Ala Glu Gly Gly Ala  
 45                    50                    55

ctc	gac	gag	gtg	cgc	gca	ctg	cgc	gag	cac	agt	ctc	acc	ctg	aac	288	
Leu	Ala	Asp	Glu	Val	Arg	Ala	Leu	Arg	Glu	His	Ser	Leu	Thr	Leu	Asn	
60													70			
acg	cgc	ctg	ggc	cag	ctg	cgc	gag	caa	ttg	cag	cag	gag	gcg	agg	gcg	336
Thr	Arg	Leu	Gly	Gln	Leu	Arg	Ala	Gln	Leu	Gln	Gln	Glu	Ala	Arg	Ala	
75													85			
gag	cct	gac	ctg	ggg	gcg	gag	cct	gct	gct	gca	ctt	ggt	ttg	cta	gcc	384
Glu	Pro	Asp	Leu	Gly	Ala	Glu	Pro	Ala	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	
90													100			
gag	cgc	gcg	ctg	gac	gct	gag	gcc	gaa	gcg	cgc	cgg	acg	acg	gca	cgc	432
Glu	Arg	Ala	Leu	Asp	Ala	Glu	Ala	Glu	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Ala	Arg	
105													115		120	
ctg	cag	cag	ctg	gac	gca	cag	ctc	cgt	gag	cat	gcg	cag	ctc	atg	agc	480
Leu	Gln	Gln	Leu	Asp	Ala	Gln	Leu	Arg	Glu	His	Ala	Gln	Leu	Met	Ser	
125													130		135	
cag	cat	agc	agc	ctc	ctc	ggc	cgc	ctg	caa	cgc	gcg	tgc	gcg	ggc	cgc	528
Gln	His	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Arg	Leu	Gln	Arg	Ala	Cys	Ala	Gly	Pro	
140													145		150	
gaa	cgg	gga	cag	cag	cag	gtc	ctg	cca	ctg	ccc	ctg	gcg	cct	ctg	gtg	576
Glu	Arg	Gly	Gln	Gln	Gln	Val	Leu	Pro	Leu	Pro	Leu	Ala	Pro	Leu	Val	
155													160		165	

cct ctg agc ctc gtg ggc agt gcc agc aac acc agc agg agg ctg gac		624
Pro Leu Ser Leu Val Gly Ser Ala Ser Asn Thr Ser Arg Arg Leu Asp		
170	175	180
caa act cca gag cac cag aga gag cag agc ttg aga cag cag ggg cct		672
Gln Thr Pro Glu His Gln Arg Glu Gln Ser Leu Arg Gln Gln Gly Pro		
185	190	195
cca tct tct ctg ctg ccc aca ggg cac ctt gct gtc ccc aca agg cca		720
Pro Ser Ser Leu Leu Pro Thr Gly His Leu Ala Val Pro Thr Arg Pro		
205	210	215
gtg ggc cca tgg agg gat tgt gca gag gct cac ggg gca ggt cac tgg		768
Val Gly Pro Trp Arg Asp Cys Ala Glu Ala His Gly Ala Gly His Trp		
220	225	230
cag agt gga gtg tat gac ctg cgg ctg ggc cgt cgt gta gta gcc gtg		816
Gln Ser Gly Val Tyr Asp Leu Arg Leu Gly Arg Arg Val Val Ala Val		
235	240	245
tgg tgt gaa cag cag cag gaa ggt gga ggc tgg act gtc atc cag aga		864
Trp Cys Glu Gln Gln Glu Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Arg		
250	255	260
cgg cag gac ggc tct gtc aac ttc ttc acc aac tgg cag cac tac aag		912
Arg Gln Asp Gly Ser Val Asn Phe Phe Thr Asn Trp Gln His Tyr Lys		
265	270	275
gcg ggc ttt ggg cgt cca gaa gga gaa tac tgg ctg ggc ctg gaa cct		960

Ala Gly Phe Gly Arg Pro Glu Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Leu Glu Pro

285

290

295

gtg cat cag gtg aca agc cgt ggg gac cac gag ctg ctg ata ctc cta      1008  
Val His Gln Val Thr Ser Arg Gly Asp His Glu Leu Leu Ile Leu Leu

300

305

310

gag gac tgg ggg ggc cgt gca gca cgc gcc cac tac gac agc ttc tcc      1056  
Glu Asp Trp Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala His Tyr Asp Ser Phe Ser

315

320

325

ttg gag cct gag agt gac cac tac cgt ctg cgg ctt ggc cag tac cac      1104  
Leu Glu Pro Glu Ser Asp His Tyr Arg Leu Arg Leu Gly Gln Tyr His

330

335

340

ggc gat gcc gga gac tcc ctc tct tgg cac aat gac aaa cct ttc agc      1152  
Gly Asp Ala Gly Asp Ser Leu Ser Trp His Asn Asp Lys Pro Phe Ser

345

350

355

360

act gtg gat agg gac aga gac tca tat tct ggt aac tgt gcc ctg tac      1200  
Thr Val Asp Arg Asp Arg Asp Ser Tyr Ser Gly Asn Cys Ala Leu Tyr

365

370

375

cat cgt ggg ggc tgg tgg tac cat gcc tgt gcc cac tct aac ctc aat      1248  
His Arg Gly Gly Trp Trp Tyr His Ala Cys Ala His Ser Asn Leu Asn

380

385

390

gga gta tgg tat cat gga ggt cat tac cgg agc cga tac cag gac ggg      1296  
Gly Val Trp Tyr His Gly Gly His Tyr Arg Ser Arg Tyr Gln Asp Gly

395

400

405

gtc tac tgg gcc gag ttc cgt ggt ggg gcg tac tct ctg aag aaa gct 1344  
 Val Tyr Trp Ala Glu Phe Arg Gly Gly Ala Tyr Ser Leu Lys Lys Ala

410

415

420

gtt atg ttg acc cgg ctt gtg cgc ttg tgactgtccc atcagtaccc 1391

Val Met Leu Thr Arg Leu Val Arg Leu

425

430

ccaagggtgt tccttatctcc t 1412

<210> 5

<211> 457

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Met Gly Thr Ala Arg Leu Arg Lys Leu Gln Leu Leu Leu Leu Gly

-20

-15

-10

Ala Trp Arg Ala Leu Gly Gly Ala Ala Arg Cys Arg Val Thr Leu Val

-5

-1 1

5

Leu Ser Pro Gln Lys Ala Thr Ser Ala Val Cys Arg Ser Ser Glu Ala

10 15 20

Thr Gln Asp Ser Glu Leu Ala Thr Leu Arg Met Arg Leu Gly Arg His  
25 30 35 40

Glu Glu Leu Leu Arg Ala Leu Gln Arg Arg Ala Ala Glu Gly Gly Ala  
45 50 55

Leu Ala Asp Glu Val Arg Ala Leu Arg Glu His Ser Leu Thr Leu Asn  
60 65 70

Thr Arg Leu Gly Gln Leu Arg Ala Gln Leu Gln Gln Glu Ala Arg Ala  
75 80 85

Glu Pro Asp Leu Gly Ala Glu Pro Ala Ala Ala Leu Gly Leu Leu Ala  
90 95 100

Glu Arg Ala Leu Asp Ala Glu Ala Glu Ala Arg Arg Thr Thr Ala Arg  
105 110 115 120

Leu Gln Gln Leu Asp Ala Gln Leu Arg Glu His Ala Gln Leu Met Ser  
125 130 135

Gln His Ser Ser Leu Leu Gly Arg Leu Gln Arg Ala Cys Ala Gly Pro

140

145

150

Glu Arg Gly Gln Gln Val Leu Pro Leu Pro Leu Ala Pro Leu Val

155

160

165

Pro Leu Ser Leu Val Gly Ser Ala Ser Asn Thr Ser Arg Arg Leu Asp

170

175

180

Gln Thr Pro Glu His Gln Arg Glu Gln Ser Leu Arg Gln Gln Gly Pro

185

190

195

200

Pro Ser Ser Leu Leu Pro Thr Gly His Leu Ala Val Pro Thr Arg Pro

205

210

215

Val Gly Pro Trp Arg Asp Cys Ala Glu Ala His Gly Ala Gly His Trp

220

225

230

Gln Ser Gly Val Tyr Asp Leu Arg Leu Gly Arg Arg Val Val Ala Val

235

240

245

Trp Cys Glu Gln Gln Glu Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Arg  
250 255 260

Arg Gln Asp Gly Ser Val Asn Phe Phe Thr Asn Trp Gln His Tyr Lys  
265 270 275 280

Ala Gly Phe Gly Arg Pro Glu Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Leu Glu Pro  
285 290 295

Val His Gln Val Thr Ser Arg Gly Asp His Glu Leu Leu Ile Leu Leu  
300 305 310

Glu Asp Trp Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala His Tyr Asp Ser Phe Ser  
315 320 325

Leu Glu Pro Glu Ser Asp His Tyr Arg Leu Arg Leu Gly Gln Tyr His  
330 335 340

Gly Asp Ala Gly Asp Ser Leu Ser Trp His Asn Asp Lys Pro Phe Ser  
345 350 355 360

Thr Val Asp Arg Asp Arg Asp Ser Tyr Ser Gly Asn Cys Ala Leu Tyr  
365                    370                    375

His Arg Gly Gly Trp Trp Tyr His Ala Cys Ala His Ser Asn Leu Asn  
380                    385                    390

Gly Val Trp Tyr His Gly Gly His Tyr Arg Ser Arg Tyr Gln Asp Gly  
395                    400                    405

Val Tyr Trp Ala Glu Phe Arg Gly Gly Ala Tyr Ser Leu Lys Lys Ala  
410                    415                    420

Val Met Leu Thr Arg Leu Val Arg Leu  
425                    430

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized linker sequence

<400> 6

caagcttatac gatgtcgacg cggccgcgg ac

32

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized linker sequence

<400> 7

cgcggccgcg tcgacatcga taagcttggt ac

32

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 8

gctcctgggc aacgtgctgg

20

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

ctgcgtctc aagctctgc

19

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

aaggtaccag tgatgttcct ctttctatg

29

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 11

tgctagcccg aatgagaaat gagacagaat

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

tagtaccat acagaatcca gctcaggttg

30

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 13

ttggtaacctt ggctggctcc catcctgg

28

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 14

ttggtacctg acctcaggta atccacct

28

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

aaggtaccag tcttgtcgcc caggctgga

29

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 16

taggtaccat aaatcacatg taactgagg

29

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 17

agcttagccca aactataaat attagcatt

30

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 18

aaggtagccaa caaataatata tgtggactca

30

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

gtcttggcct caggcctctg g

21

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 20

tacctcagtt acatgtgatt tatg

24

### 【0032】

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

AGF Tgマウスの耳パンチ閉塞活性を調べた結果を示す図である。I及びJの、軟骨組織を矢印の頭部で示した。

AおよびB：AGF Tgマウスの耳パンチの大きさを示す。

CおよびD：正常マウスの耳パンチの大きさを示す。

E：耳パンチで穴を開けていない領域の薄切切片を示す。

F, G, H：穴を開けて組織が再生された領域の薄切切片を示す。

I：Fにおいて、穴を開けていない組織由来の領域の拡大図を示す。

J：Fにおいて、穴を開けて組織が再生された領域の拡大図を示す。

#### 【図2】

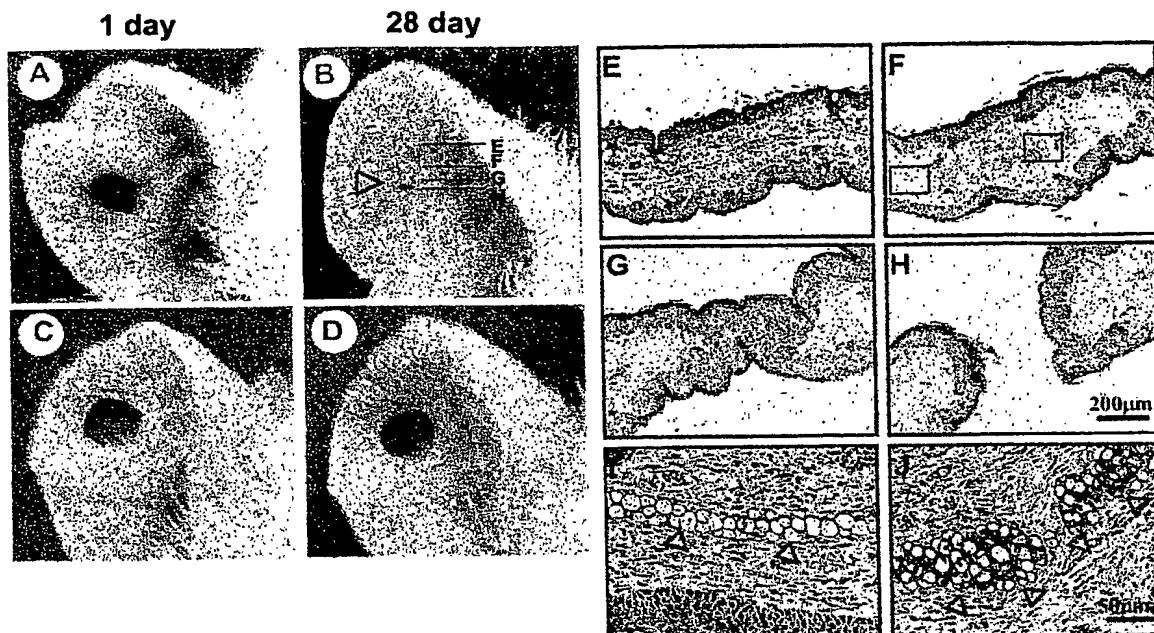
OP9細胞由来リコンビナントAGFの耳パンチ閉塞活性を示す写真である。上はマウスAGFの安定発現株（OP9/AGF）を投与した場合、下はベクターのみをトランスフェクションしたOP9細胞株（OP9/vector）を投与した場合の耳パンチの穴の大きさの変化を示す。

#### 【図3】

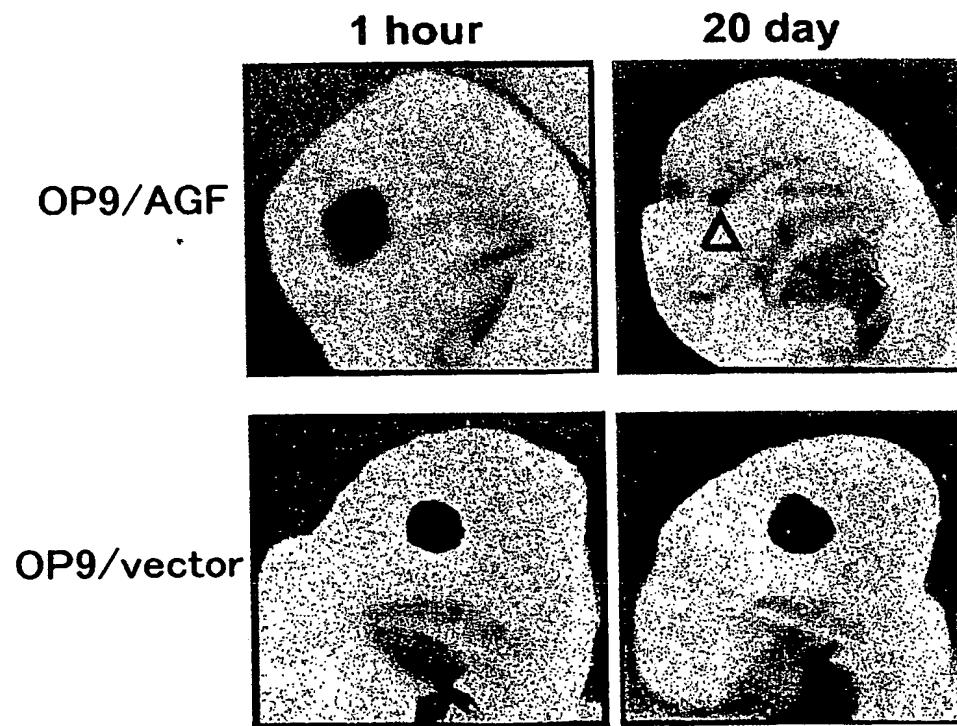
実施例2で行われたルシフェラーゼ活性を示す図を示す。

【書類名】 図面

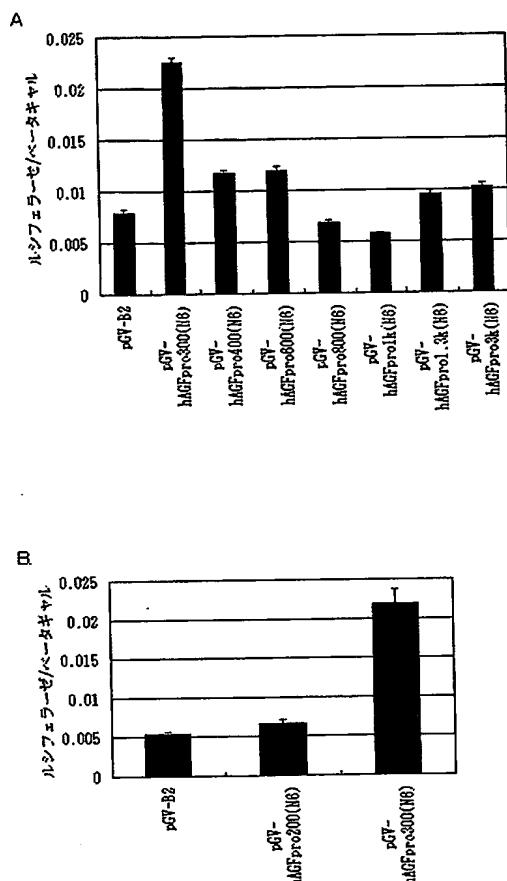
【図 1】



【図 2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

AGF遺伝子のプロモーター活性を促進しAGFの発現を亢進する物質である軟骨組織再生剤、真皮組織再生剤及び／又は結合組織再生剤をスクリーニングする方法を提供する。

【解決手段】

本発明者らは、AGF遺伝子上流配列を取得し、該配列がプロモーター活性を有することを見出した。また、前記プロモーター領域を利用したAGFの発現を制御する物質をスクリーニングする方法を構築した。AGF蛋白質が強力な組織再生活性を有しており、表皮組織に加えて、真皮組織、皮下組織、軟骨組織を再生という知見からAGFの発現を制御する物質をスクリーニングする方法が軟骨組織再生剤、真皮組織再生剤及び／又は結合組織再生剤をスクリーニングする方法として利用できることを見出し本発明を完成した。

【書類名】 出願人名義変更届  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2003-163016  
【承継人】  
【識別番号】 899000079  
【氏名又は名称】 学校法人慶應義塾  
【承継人代理人】  
【識別番号】 100090251  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 森田 憲一  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 017813  
【納付金額】 4,200円

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-163016
受付番号	50400813331
書類名	出願人名義変更届
担当官	神田 美恵 7397
作成日	平成16年 6月16日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】	平成16年 5月14日
【承継人】	
【識別番号】	899000079
【住所又は居所】	東京都港区三田2丁目15番45号
【氏名又は名称】	学校法人慶應義塾
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	100090251
【住所又は居所】	東京都板橋区板橋二丁目67番8号 板橋中央ビル5階
【氏名又は名称】	森田 憲一

特願 2003-163016

出願人履歴情報

識別番号

[000006677]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

1990年 8月10日

新規登録

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

山之内製薬株式会社

特願 2003-163016

出願人履歴情報

識別番号

[899000079]

1. 変更年月日

1999年 9月17日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都港区三田2丁目15番45号

氏 名

学校法人慶應義塾